薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
107 (12) 964-970 (1987)

抱合型薬物の代謝研究 (第1報) 3-デオキシエストラジオール

17-サルフェートの可能な代謝産物の合成

和田祐爾,^a 黒沢隆夫,^b 渡辺一弘,^a 高木英利,^a

藤間貞彦,^b 吉沢逸雄*,^a

北海道薬科大学,^a 東日本学園大学薬学部^b

Studies on the Metabolism of Conjugated Drugs. I. Synthesis of the Potential Metabolites of 3-Deoxyestradiol 17-Sulfate

YUJI WADA,^a TAKAO KUROSAWA,^b KAZUHIRO WATANABE,^a HIDETOSHI TAKAGI,^a
MASAHICO TOHMA,^b and ITSUO YOSHIKAWA*,^a

*Hokkaido Institute of Pharmaceutical Sciences,^a Katsuraoka-cho, 7-1, Otaru,
Hokkaido, 047-02, Japan and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Higashi-
Nippon-Gakuen University,^b Ishikari-Tobetsu, Hokkaido, 061-02, Japan*

(Received July 13, 1987)

For studies on the metabolism of 17 β -hydroxyestra-1,3,5(10)-triene (3-deoxyestradiol) sulfate, authentic compounds as potential metabolites were prepared. The synthetic procedures of 2-, 3-, 4-, 6 α -, and 6 β -hydroxylated products of 3-deoxyestradiol 17-sulfate are described.

Keywords—3-deoxyestradiol; synthesis; sulfate; metabolic product; 3-deoxyestradiol sulfate; metabolism; conjugated drug

従来、薬物代謝における抱合は、解毒及び排泄を主目的とする生体反応と見なされていたが、近年、その抱合に対する認識が大きく変ってきた。主な理由は、薬物が抱合を受けることによって、その薬理作用がむしろ増大したり、¹⁾あるいは、反応性が増して生体に危害を加え、ときには癌発生の原因になる²⁾例などが増えてきたからである。そのような意味から、抱合型薬物の体内動態を詳しく検討することは、単に代謝全貌の解明に留まらず、医薬品の安全性を評価する上で極めて重要な指針となる筈である。

一般に、薬物をはじめとする脂溶性の有機化合物が生体に取り込まれると、まず、水酸基のような極性官能基の導入 (phase I 反応)、ついで、その抱合 (phase II 反応) という順序で代謝を受ける。これとは逆の、すなわち、phase II 反応が先行するような経路は、薬物の代謝においては今のところ例がないが、内因性ステロイドホルモンの生合成においては通常である。例えば、種々のステロイドサルフェートやグルクロナイドは、酸化、還元、転位酵素などの基質となって、その分子骨格の修飾あるいは変換を受ける。^{3,4)} かりに、抱合が官能基導入に先行するこのような経路が薬物の代謝においても存在するならば、その代謝パターンは通常のそれと大きく異なるに違いない。抱合型ステロイド⁴⁾で見られたように、薬物分子への官能基の導入は、抱合基の影響を受けて特定の部位に限定されるかも知れない。逆に、分子の特定部位だけが水酸化を受けるような薬物の代謝では、案外、phase II 反応が先行した結果かも知れない。

このような可能性の有無を調べるために、著者らは 3-deoxyestradiol sulfate (potassium estra-1,3,5(10)-trien-17 β -yl sulfate, **2**) をモデル化合物として選び、その代謝研究を計画した。**2** に注目した理由は以下の4点に立脚する。(1) 3-deoxyestradiol (**1**) が lipid-shifting 剤として実際に医薬品として使われていた。⁵⁾ (2) 遊離型の 3-deoxyestrogen の代謝については、すでに南原ら⁶⁾ が家兎を使って詳細に検討しており、その結果が大いに参考となる。(3) 著者らが行ってきた estradiol 17-sulfate (**7**) の代謝の成果⁷⁾ が有効に利用できる。(4) 代謝を受けると **2** の大半は、特異な生理作用を有するエストロゲン (女性ホルモン) やカテコールエストロゲン⁸⁾ に変換すると予想され、薬物の薬理作用と代謝物の生理作用の相互関係に興味を持たれる。

本論文は、**2** の代謝研究に必要なであろう可能な代謝産物の標品を確保するため、その合成法について述

べるものである。

はじめに、研究を遂行する上で大量に確保しておかねばならない基質 **2** を合成した。**2** は、3-deoxyestradiol (**1**) をピリジン中クロルスルホン酸と反応させ容易に得ることができたが、その構造式からも窺えるように、比較的水に溶けにくく、100 ml の水に約 40 mg しか溶けない (室温)。

つぎに、代謝物の標品類を合成した。ただし、**7** の代謝ではその水酸化が主として C₂-, C₄-, 及び C₆- 位に起きる^{7a,9)}ことから、**2** についても同様な傾向が予想され、合成の対象は代謝物として可能性の高い以下の化合物に限定した。

1. モノヒドロキシ化合物

2 に水酸基 1 個導入されたものとしては、C₂-, C₃-, C₄-, 及び C₆- 水酸化体が考えられる。

2 位水酸化物 Estr-1,3,5(10)-triene-2,17 β -diol (**3**)¹⁰⁾ を塩化ベンゾイルを用いて Schotten-Baumann 反応を行うと、2-benzoyloxyestra-1,3,5(10)-trien-17 β -ol (**4**) が得られた。**4** を上述の方法によってそのサルフェート potassium 2-benzoyloxyestra-1,3,5(10)-trien-17 β -yl sulfate (**5**) に導いた。最後に、**5** をケン化すると目的の化合物 potassium 2-hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17 β -yl sulfate (**6**) が得られた (**3** からの over-all yield は約 30%)。本法は工程も長いうえに、収率も低く、適当な合成法とは言い難い。今後のことも考え、以下の one-step 合成法を開発した。

3 をピリジン中でクロルスルホン酸と反応させ、そのジサルフェートの生成を確認後、生成物をアリルサルファターゼで加水分解した。イオン交換樹脂によりカリウム塩として得られた生成物は、上記の方法で合成した標品 **6** と完全に一致した。収率は極めて高く、約 91% であった。簡便性と高収率の点で、本法はエストロジェン 17-サルフェート類の合成に適したものであろう。

3 位水酸化物 **2** の 3 位水酸化生成物は estradiol 17-sulfate (**7**) に相当する。**7** についても、上記の簡便な方法によって高収率 (約 87%) で得ることができたが、これはすでに Schotten-Baumann 法によって得られた標品^{7a)}と完全に一致した。

4 位水酸化物 エストロジェン代謝において C₄- 位の水酸化は C₂- 位と並んで重要であり、⁹⁾ **7** の代謝でも若干認められる。^{7b)} 当然、**2** の場合もその C₄- 位水酸化が予想されるが、今のところ、A 環の C₄- 位のみ水酸基をもつエストロジェンは知られていないので、まずその合成を行った。出発原料には 4-methoxyestradiol (**9**)¹¹⁾ を選んだ。

化合物 **9** を 1-フェニル-5-クロロテトラゾール¹³⁾ と反応させ、そのエーテル (**10**) に導いた。**10** は結晶化には成功しなかったが、プロトン核磁気共鳴吸収スペクトル (NMR)、マスペクトル (MS) 等の結果からその構造は間違いないものと思われたので、つぎの反応に供した。**10** を水素加分解すると、4-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17 β -ol (**11**) が得られたが、これはいったん酸化して 4-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-one (**12**) に導いた。その理由は、つぎの脱メチル化反応において、**11** ではその C₁₇- 位のヨーソ化の起きる恐れがあるからである。ついで、**12** の脱メチル化を Olah ら¹³⁾の方法によって行うと高収率で 4-hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17-one (**13**) を得ることができた。常法に従って **13** を NaBH₄ で還元、目的の化合物 estr-1,3,5(10)-trien-4,17 β -diol (**14**) が得られた。一連の工程で得られた各化合物は NMR, MS, 元素分析等の結果からそれらの構造が確認された。

最後に、アリルサルファターゼを用いる上記の簡便な方法によって、**14** を目的のサルフェート potassium 4-hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17 β -yl sulfate (**15**) に好収率で導くことができた。

6 位水酸化物 C₆- 位の水酸化物としては、6 α - 及び 6 β -ヒドロキシ体が予想され、それらは 6-oxoestra-1,3,5(10)-trien-17 β -ol (**16**) のサルフェート, potassium 6-oxoestra-1,3,5(10)-trien-17 β -yl sulfate (**17**) を出発原料として合成した。

17 を NaBH₄ で還元すると、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で接近した 2 つのピークを示す生成物を与える。両ピークの相対保持時間 (rt_R) は内部標準 (2-methoxyestradiol, **22**) を基準 (22.5 分) としたとき、それぞれ 0.31 及び 0.42 で、ピーク高の比は約 1 : 9 であった。反応物の再結晶を繰り返すと、rt_R = 0.42 の生成物が得られた。その NMR における C₆- 位水酸基の付け根プロトンの分裂パターン¹⁴⁾から、水酸基は α 配位と推定された。これは、サルフェートを緩やかなソルボリシス¹⁵⁾に付すと、唯一の生成物として estr-1,3,5(10)-triene-6 α ,

17 β -diol (19)¹⁴⁾ を与えることから支持された。したがって、得られたサルフェート (カリウム塩) は potassium 6 α -hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17 β -yl sulfate (18) と決定された。

つぎに, 18 の C₆-位異性体はつぎのようにして合成した。17 を酸化白金を用いて接触還元すると, その生成物の HPLC では NaBH₄ による生成物と同じ *r*_T, 0.31 及び 0.42 の2つのピークが見られ, 両者のピーク高比は約 3:1 であった。この生成物を分取用の HPLC に付し, 両者を分離した。 *r*_T=0.31 の分画を結晶として得ることができたが, 以下の2点から, これは potassium 6 β -hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17 β -yl sulfate (20) と決定された。すなわち, その NMR における C₆-位プロトンの分裂パターン及びその緩和なソルボリシスにより, *estra*-1,3,5(10)-triene-6 β ,17 β -diol (21)¹⁴⁾ を唯一の生成物を与える点である。

なお, *r*_T=0.42 の微量副生物は結晶化には至らなかったが, HPLC によって 18 と判明した。

2. ジヒドロキシ化合物

水酸基の2個導入された代謝物としては, 多数の組み合わせが可能であるが, 7 のラット肝による代謝での結果⁷⁾ から判断して, その数はおのずと限定されよう。恐らく, ジヒドロキン体としては, C₂- と C₃-, あるいは, C₃- と C₄- の両部位が水酸化を受けたカテコール体が大半と予想されるが, そのような化合物 potassium 2,3-dihydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17 β -yl sulfate (23)¹⁷⁾ 及び potassium 3,4-dihydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17 β -yl

1: R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =H
2: R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =SO ₃ K
3: R ₁ =OH	R ₂ =H	R ₃ =H
4: R ₁ =PhCOO	R ₂ =H	R ₃ =H
5: R ₁ =PhCOO	R ₂ =H	R ₃ =SO ₃ K
6: R ₁ =OH	R ₂ =H	R ₃ =SO ₃ K
7: R ₁ =H	R ₂ =OH	R ₃ =SO ₃ K
8: R ₁ =H	R ₂ =OH	R ₃ =H
22: R ₁ =OCH ₃	R ₂ =OH	R ₃ =SO ₃ K
23: R ₁ =OH	R ₂ =OH	R ₃ =SO ₃ K

16: R ₁ =O	R ₂ =H
17: R ₁ =O	R ₂ =SO ₃ K
18: R ₁ =	R ₂ =SO ₃ K
19: R ₁ =	R ₂ =H
20: R ₁ =	R ₂ =SO ₃ K
21: R ₁ =	R ₂ =H

9: R ₁ =OH	R ₂ =OCH ₃	R ₃ =
10: R ₁ =	R ₂ =OCH ₃	R ₃ =
11: R ₁ =H	R ₂ =OCH ₃	R ₃ =
12: R ₁ =H	R ₂ =OCH ₃	R ₃ =O
13: R ₁ =H	R ₂ =OH	R ₃ =O
14: R ₁ =H	R ₂ =OH	R ₃ =
15: R ₁ =H	R ₂ =OH	R ₃ =
24: R ₁ =OH	R ₂ =OH	R ₃ =

Chart 1

sulfate (24)^{7b)} はすでに合成に成功している。また、これら抱合型カテコールはその代謝過程において更にグアヤコール体にも変換すると予想されるが、それら4化合物の合成についても既に報告した。^{16,18)}

3. 要約

以上、3-deoxyestradiol 17-sulfate (2) の代謝研究で必要とされる主な標品のうち、その C₂-, C₄-, C_{6α}-, 及び C_{8β}-位水酸化体4種 (6, 15, 18, 及び 20) を合成した。これらに既知化合物の 7 と抱合型カテコール (23 及び 24) を加えると、合計7種の水酸化体の標品が揃ったことになる。

以上、2 の代謝研究を始めるに当たって、最少限必要と思われる標品を確保できた。

実 験 の 部

ステロイド化合物 エストラジオール (8) は Steraloids 社 (N.H., U.S.A.) より購入。1 は Musliner ら,¹²⁾ 3 及び 16 は Nambara ら,¹⁴⁾ 9 は Numazawa ら¹¹⁾ の方法により合成、それらの構造は NMR, MS, 紫外吸収スペクトル (UV), 赤外吸収スペクトル (IR), 融点及び元素分析の結果から確認した。

試薬類 アリルサルファターゼ (H-2 型) は Sigma 社 (MO, U.S.A.) より購入。イオン交換樹脂は Dow Chemical 社製 Dowex W50 型 (×8, 200—400 メッシュ) を使い、その 50 g を内径 2 cm のカラムに充填して用いた。アンバーライト XAD-2 樹脂は Rohm・Hass 社 (フィラデルフィア, U.S.A.) より購入、その 200 g を内径 5 cm のカラムに充填して用いた。薄層クロマトグラフィー (TLC) は Merck 社製 Silica gel 60F₂₅₄ プレート (厚さ: 0.25 mm) を使用。その他の試薬及び溶媒類は、市販特級品をそのまま使用。

測定機器 融点は一視野式微量融点測定装置 (三田村, 東京) で測定、未補正。UV ($\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm (ϵ)) は 200-20 型 (日立, 東京) で測定、sh は肩。IR ($\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ cm⁻¹) は A-102 型 (日本分光, 東京) で測定。NMR (δ) は JMN-FX-100 (日本電子, 東京) で測定し、内部標準はテトラメチルシラン。s は singlet, d は doublet, t は triplet, m は multiplet の略。MS (m/z) は 9000B 型 (島津, 京都) を用い、直接導入法で測定。

HPLC は本体に 803 型 (東洋曹達, 東京) で、ODS-120A (5 μ m, 東洋曹達) を充填したステンレスカラム (25 cm×4.6 mm, i.d.) を装備した。分取 HPLC は上記と同じ固定相を充填したステンレスカラム (30 cm×7.5 mm, i.d.) を使用。検出器には、Uvidec 100-II 型紫外吸収検出器 (日本分光) を使い、測定波長は 280 nm。移動相にはつぎの2種の溶液を用いた:

A 液, メタノール-水 (20 : 80, v/v); B 液, 0.5% NH₄H₂PO₄ (pH 3.0)-メタノール (45 : 55, v/v)。

Potassium Estradiol-1,3,5(10)-trien-17 β -yl Sulfate (2) 乾燥ピリジン (20 ml) にクロルスルホン酸 (1 ml) を添加、50°C で 1 時間攪拌、これに 474 mg の 1 を加えて 50°C で 6 時間、更に室温で 14 時間攪拌。減圧下に溶媒を留去、残渣に水 10 ml を加え、ついで 0.1 N KOH で中和。この溶液を *n*-ブタノール (200 ml) と合わせ、有機層を水洗 (30 ml×3)。減圧下に溶媒を留去すると 470 mg の無色粉末が得られた。これを 800 ml の水に溶かし、イオン交換樹脂 (K⁺ 型) に導通。溶出液を *n*-ブタノールで抽出、抽出液を減圧下に濃縮、得られた結晶性粉末をメタノールから再結晶、無色板状晶 (382 mg) が得られた。mp 223—225°C。UV: 213 (7600), 259 (700), 266 (800), 247 (700)。IR: 3500—3400 (H₂O), 1590—1450 (芳香環), 1240—1220 (OSO₃)。NMR (重メタノール): 0.85 (3H, s, C₁₈-H), 4.30 (1H, t, $J=8.0$ Hz, C₁₇-H), 7.01—7.12 (4H, m, 芳香環-H)。元素分析 C₁₈H₂₈KO₄S·H₂O 計算値: C, 52.66; H, 6.14; S, 7.81。実験値: C, 52.54; H, 6.07; S, 7.66。

2-Benzoyloxyestra-1,3,5(10)-trien-17 β -ol (4) 480 mg の 3 を溶かした 1 N NaOH 溶液 (100 ml) を氷水で冷却、これに塩化ベンゾイルのエーテル溶液 (1 : 1, v/v) 10 ml を滴下、ついで、反応液を室温下で 7 時間攪拌。反応液を 4 N HCl で中和、これに NaHCO₃ をその終濃度が約 2% となるように加え、室温下で 15 時間攪拌。反応液を酢酸エチルで抽出、抽出液を 0.1 N KOH、ついで水で洗浄、乾燥 (Na₂SO₄)。溶媒を留去、得られた粉末 (750 mg) をメタノールから再結晶、無色針状晶 (601 mg) が得られた。mp 83—84°C。UV: 231 (16400), 268 (3400), 276 (3000)。IR: 3400—3300 (OH), 1735 (エステル), 1600, 1495 (芳香環)。NMR (CDCl₃): 0.79 (3H, s, C₁₈-H), 3.74 (1H, t, $J=8.0$ Hz, C₁₇-H), 6.98 (1H, dd, $J=8.0$ 及び 2.0 Hz, C₃-H), 7.10 (1H, d, $J=2.0$ Hz, C₁-H), 7.15 (1H, d, $J=8.0$ Hz, C₄-H), 7.45—7.68 (3H, m, ベンゾイル基の C₃-, C₄-, 及び C₅-H), 8.16—8.30 (2H, m, ベンゾイル基の C₂- 及び C₆-H)。MS: 376 (M⁺), 105 (PhCO⁺)。元素分析 C₂₅H₂₈O₈ 計算値: C, 79.75; H, 7.50。実験値: C, 79.86; H, 7.42。

Potassium 2-Benzoyloxyestra-1,3,5(10)-trien-17 β -yl Sulfate (5) 10 ml の乾燥ピリジンにクロルスルホン酸 (0.3 ml) を加えて 50°C で 30 分攪拌、これに 180 mg の 4 を加え、更に 50°C で 6 時間、ついで室温下で 14 時間攪拌。減圧下に溶媒を留去、得られた残渣に約 5 ml の水を加えた後 0.1 N KOH で中和。この溶液を *n*-ブタノール (100 ml) と合わせ、有機層を水洗 (20 ml×3)。減圧下に *n*-ブタノールを留去、得られた残渣をメタノールか

ら再結晶, 無色微細針状晶 (140 mg) が得られた. mp 232—235°C. UV: 230 (11500), 268 (2400), 276 (2100). IR: 3500—3300 (H₂O), 1735 (エステル), 1600, 1495 (いずれも芳香環), 1250—1210 (OSO₃). NMR (重メタノール): 0.86 (3H, s, C₁₈-H), 4.32 (1H, t, $J=8.0$ Hz, C₁₇-H), 6.91 (1H, dd, $J_1=8.0$, $J_2=2.0$ Hz, C₈-H), 7.08 (1H, d, $J=2.0$ Hz, C₁-H), 7.14 (1H, d, $J=8.0$ Hz, C₄-H), 7.47—7.72 及び 8.08—8.24 (5H, m, ベンゾイル基-H). 元素分析 C₂₅H₂₇KO₆S·H₂O 計算値: C, 58.57; H, 5.70; S, 6.26. 実験値: C, 58.43; H, 5.49; S, 6.04.

Potassium 2-Hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17 β -yl Sulfate (6) 200 mg の **5** を溶かしたメタノール溶液 (20 ml) に, 0.1 N KOH (10 ml) を添加, 室温で一晩攪拌. 反応液を 0.1 N HCl で中和したのち, ベンゼンで洗浄. 水層部を XAD-2 樹脂のカラムに導通. 水洗後, メタノールで溶出, 溶出液を減圧下に濃縮. 得られた粉末 141 mg をエタノールから再結晶, 無色微細針状晶 (94 mg) が得られた. mp 223—224°C. UV: 220 (6400), 282 (2300), 289 (2100). IR: 3550—3300 (H₂O), 1605, 1500 (いずれも芳香環), 1240—1205 (OSO₃). NMR (DMSO-*d*₆): 0.85 (3H, s, C₁₈-H), 4.32 (1H, t, $J=8.0$ Hz, C₁₇-H), 6.45 (1H, d, $J=8.0$ Hz, C₈-H), 6.64 (1H, d, $J=2.0$ Hz, C₁-H), 6.80 (1H, d, $J=8.0$ Hz, C₄-H). 元素分析 C₁₈H₂₈KO₅S·H₂O 計算値: C, 52.91; H, 6.17; S, 7.85. 実験値: C, 52.71; H, 5.89; S, 7.64.

アリルサルファターゼによる 6 の合成法 乾燥ピリジン (10 ml) にクロルスルホン酸 (0.25 ml) を加え 50°C で 30 分攪拌. これに 100 mg の **3** を加え 50°C で 4 時間, ついで室温で 6 時間攪拌. TLC (展開溶媒: クロロホルム-酢酸エチル-酢酸, 100 : 8 : 1, v/v/v) で標品の **6** と比較して反応の完結を確認したので, 減圧下に溶媒を留去. 濃縮液に 10% NH₄OH (1 ml), ついで *n*-ブタノール (50 ml) を加えた. 有機層は水洗 (20 ml×2) 後, 減圧下に濃縮, 得られた残渣を 10 ml の酢酸緩衝液 (100 mM, pH 5.0) に溶かし, これに酵素活性が 1 ml あたり 30 unit となるようにアリルサルファターゼを加え, 37°C で 24 時間インキュベーション. 反応液はいったんろ過した後, XAD-2 樹脂カラムに付し, 水洗後メタノールで抱合体を溶出. 溶離液は減圧下に濃縮, 得られた残渣を 5 ml の水に溶解, これをイオン交換樹脂 (K⁺ 型) に導通. 溶出液 (約 25 ml) を減圧下に濃縮. 粗結晶 (170 mg) をメタノールから再結晶, 無色微細針状晶 (135 mg) が得られた. これは上記サルフェート (**6**) と混融するも融点の降下が認められなかった.

Potassium 3-Hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17 β -yl Sulfate (7) アクリルサルファターゼを使う **6** の合成法に準じて, **8** (120 mg), クロルスルホン酸 (0.3 ml), ピリジン (10 ml) を用いて反応を行った. 同様に処理して目的のサルフェート (**7**) を 145 mg 得た. これは別途合成した標品^{7a)}と混融するも融点の降下は認められなかった.

4-Methoxy-3-(1-phenyl-5-tetrazoyloxy)estra-1,3,5(10)-trien-17 β -ol(10) 化合物 **9** (1.0 g) と 1-フェニル-5-クロロテトラゾール (0.7 g) をジメチルホルムアミド (8 ml) に溶かし, これに K₂CO₃ (3 g) を加えて 80°C で 30 分攪拌. 反応液に氷水 (100 ml) を加えてエーテルで抽出 (40 ml×3). 抽出液は水洗, 乾燥 (Na₂SO₄), 最後に減圧下で濃縮. 得られた粉末 1.7 g をカラムクロマト (SiO₂, 100 g) に付し, *n*-ヘキサン-酢酸エチル (2 : 1, v/v) 溶出部から, TLC (アセトン-ベンゼン, 10 : 90, v/v) で単一のスポットを示す粉末 1.1 g を得た. 種々の溶媒で再結晶を試みたが, アモルファス状粉末を得るに止った. UV: 220 (19700, sh), 269 (3200). IR: 3400 (OH), 1595, 1540 (ともに芳香環). NMR (CDCl₃): 0.83 (3H, s, C₁₈-H), 3.46 (1H, t, $J=8.0$ Hz, C₁₇-H), 3.66 (3H, s, OCH₃), 7.25—7.82 (8H, m, 芳香環-H). MS: 446 (M⁺), 301 (M⁺ - テトラゾイル基).

4-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17 β -ol (11) 840 mg の **10** を 20 ml のメタノールに溶かし, これに 10% Pd-C (500 mg) を加えて常圧下で 36 時間振とう. 触媒をろ別後, ろ液は減圧下に濃縮, 得られた残渣をカラムクロマト (SiO₂: 100 g) に付し, *n*-ヘキサン-酢酸エチル (3 : 1, v/v) 溶出部より粗結晶 (480 mg) を得た. *n*-ヘキサンと酢酸エチルの混液から再結晶, 無色針状晶 (390 mg) を得た. mp 133—135°C. UV: 220 (8340, sh), 272 (1660), 279 (1670). IR: 3560 (OH), 1600, 1580 (ともに芳香環). NMR (CDCl₃): 0.80 (3H, s, C₁₈-H), 3.72 (1H, t, $J=8.0$ Hz, C₁₇-H), 3.82 (3H, s, OCH₃), 6.70 (1H, d, $J=8.0$ Hz, C₈-H), 6.95 (1H, d, $J=8.0$ Hz, C₁-H), 7.12 (1H, t, $J=8.0$ Hz, C₂-H). MS: 286 (M⁺). 元素分析 C₁₉H₂₈O₂ 計算値: C, 79.68; H, 9.15. 実験値: C, 79.38; H, 9.14.

4-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-one (12) 240 mg の **11** をアセトン (5 ml) に溶かし氷冷, これに攪拌下で Jones 試薬 (3 ml) を滴下, そのまま 10 分間攪拌. 反応液に水 (30 ml) を加えたのちエーテル抽出 (10 ml×3). 抽出液は水洗, 乾燥 (Na₂SO₄). 溶媒を留去し, 得られた残渣をメタノールから再結晶, 無色板状晶 (195 mg) が得られた. mp 166—169°C. UV: 220 (8600, sh), 272 (1600), 280 (1650). IR: 1740 (カルボニル基), 1580 (芳香環). NMR (CDCl₃): 0.92 (3H, s, C₁₈-H), 3.82 (3H, s, OCH₃), 6.72 (1H, d, $J=8.0$ Hz, C₈-H), 6.94 (1H, d, $J=8.0$ Hz, C₁-H), 7.12 (1H, t, $J=8.0$ Hz, C₂-H). MS: 284 (M⁺). 元素分析 C₁₉H₂₄O₂ 計算値: C, 80.24; H, 8.51. 実験値: C, 80.21; H, 8.47.

4-Hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17-one (13) 化合物 **12** (150 mg) を 6 ml のアセトニトリルに溶かし、これにトリメチルクロシラン (1.6 ml) とヨウ化ナトリウム (450 mg) を加えてアルゴン気流下、80°C で 90 分攪拌。反応液に水 (50 ml) を加え、酢酸エチルで抽出 (20 ml×3)。抽出液は 5% Na₂S₂O₃ 及び水で洗浄、乾燥 (Na₂SO₄)。溶媒を減圧下に留去、得られた残渣をメタノールより再結晶、無色柱状晶 (121 mg) が得られた。mp 283—285°C。UV: 220 (8100, sh), 276 (1950), 282 (1900)。IR: 3350 (OH), 1710 (カルボニル基), 1580 (芳香環)。NMR (CDCl₃): 0.94 (3H, s, C₁₈-H), 4.70 (1H, s, C₄-OH, D₂O 添加により消失), 6.66 (1H, d, *J*=8.0 Hz, C₃-H), 6.95 (1H, d, *J*=8.0 Hz, C₁-H), 7.05 (1H, t, *J*=8.0 Hz, C₈-H)。MS: 270 (M⁺)。元素分析 C₁₈H₂₂O₂ 計算値: C, 79.96; H, 8.20。実験値: C, 79.81; H, 8.16。

Estra-1,3,5(10)-trien-4,17β-diol (14) **13** (70 mg) をメタノールとジクロロメタンの混液 (3:1, v/v, 15 ml) に溶かし、氷冷。これに NaBH₄ (40 mg) を加えて 30 分攪拌。反応液を減圧下に濃縮。水 (20 ml) を加え、酢酸エチルで抽出 (5 ml×3)。抽出液は水洗、乾燥 (Na₂SO₄)、減圧下に濃縮。得られた残渣を *n*-ヘキサンと酢酸エチルの混液から再結晶、無色針状晶 (61 mg) が得られた。mp 204—206°C。UV: 220 (8950, sh), 275 (2400), 282 (2300)。IR: 3540—3280 (OH), 1580 (芳香環)。NMR (CDCl₃): 0.80 (3H, s, C₁₈-H), 3.75 (1H, t, *J*=8.0 Hz, C₁₇-H), 4.75 (1H, s, C₄-OH, D₂O 添加により消失), 6.64 (1H, d, *J*=8.0 Hz, C₃-H), 6.93 (1H, d, *J*=8.0 Hz, C₁-H), 7.10 (1H, t, *J*=8.0 Hz, C₂-H)。MS: 272 (M⁺)。元素分析 C₁₈H₂₄O₂ 計算値: C, 79.37; H, 8.88。実験値: C, 79.26; H, 8.66。

Potassium 4-Hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17β-yl Sulfate (15) 乾燥ピリジン (10 ml) にクロルスルホン酸 (0.3 ml) を加えて 60°C で 30 分加温。これに **14** (100 mg) を加えて 60°C で 90 分加温。ピリジンを減圧下に留去、得られた残渣に 10% NH₄OH (1 ml) 及び *n*-ブタノール (50 ml) を加えた。有機層は水洗 (10 ml×2) 後、減圧下に濃縮、得られた残渣 (170 mg) を 10 ml の酢酸緩衝液 (100 mM, pH 5.0) に溶かし、前述と同じ条件下で酵素水解に付した。反応液はいったんろ過後、XAD-2 樹脂で処理、メタノール溶出液を減圧下に濃縮した。生成物 (163 mg) をエタノールから再結晶、微細針状晶 (90 mg) を得た。mp 205—207°C。UV: 221 (7900, sh), 275 (1700), 281 (1650)。IR: 3500—3200 (OH, H₂O), 1580 (芳香環), 1240—1216 (OSO₃)。NMR (重メタノール): 0.69 (3H, s, C₁₈-H), 4.04 (1H, t, *J*=8.0 Hz, C₁₇-H), 6.59 (1H, d, *J*=8.0 Hz, C₃-H), 6.74 (1H, *J*=8.0 Hz, C₁-H), 6.90 (1H, t, *J*=8.0 Hz, C₂-H), 9.05 (1H, s, C₄-OH, D₂O 添加により消失)。元素分析 C₁₈H₂₃KO₅S·H₂O 計算値: C, 52.91; H, 6.17; S, 7.85。実験値: C, 52.76; H, 6.01; S, 7.66。

Potassium 6-Oxoestra-1,3,5(10)-trien-17β-yl Sulfate (17) 乾燥ピリジン (10 ml) にクロルスルホン酸 (0.3 ml) を加え、50°C で 30 分攪拌。これに 125 mg の **16** を加え、50°C で 6 時間、ついで室温で 12 時間攪拌。減圧下でピリジンを留去、得られた残渣を 0.1 N KOH で中和、これに *n*-ブタノール (100 ml) を加えた。有機層を水洗 (20 ml×3)、減圧下に濃縮すると、油状物質 (181 mg) が得られた。これを少量の水に溶解、ついで、イオン交換樹脂 (K⁺ 型) に付し、溶出液を減圧下に濃縮、得られた粉末 (156 mg) をエタノールより再結晶、無色針状晶 (105 mg) が得られた。mp 213—214°C。UV: 251 (9600), 297 (1650)。IR: 3500—3200 (H₂O), 1680 (カルボニル基), 1600, 1500, 1450 (いずれも芳香環), 1260—1220 (OSO₃)。NMR (DMSO-*d*₆): 0.70 (3H, s, C₁₈-H), 4.08 (1H, t, *J*=8.0 Hz, C₁₇-H), 7.20—7.60 (3H, m, C₁-, C₂-, 及び C₃-H), 7.88 (1H, dd, *J*₁=8.0, *J*₂=2.0 Hz, C₄-H)。元素分析 C₁₈H₂₁KO₅S·H₂O 計算値: C, 53.18; H, 5.70; S, 7.89。実験値: C, 52.90; H, 5.50; S, 7.54。

Potassium 6α-Hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17β-yl Sulfate (18) **17** (186 mg) をメタノール (5 ml) に溶かし、これに NaBH₄ (40 mg) を加えて室温下 90 分攪拌。減圧下に溶媒を留去、得られた残渣に水 (10 ml) を加え、1 N HCl で中和。この溶液をイオン交換樹脂で処理し、溶出液を減圧下に濃縮。得られた粗結晶 (240 mg) をエーテルとエタノールの混液から再結晶、無色微細針状晶 (92 mg) を得た。mp 195—200°C。UV: 211 (8400, sh), 264 (420), 273 (290)。IR: 3600—3200 (OH), 1588, 1557 (ともに芳香環), 1227 (OSO₃)。NMR (DMSO-*d*₆): 0.70 (3H, s, C₁₈-H), 4.05 (1H, t, *J*=8.0 Hz, C₁₇-H), 4.58 (1H, m, 6β-H), 7.06—7.53 (4H, m, 芳香環-H)。元素分析 C₁₈H₂₃KO₅S·H₂O 計算値: C, 52.92; H, 6.17; S, 7.85。実験値: C, 52.94; H, 6.28; S, 7.65。

Potassium 6β-Hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17β-yl Sulfate (20) PtO₂ (130 mg) をエタノール (40 ml) に入れ、いったん常圧下で水素化。この懸濁液に **17** (127 mg) を加え、常圧下で水素気流中 40 時間攪拌。触媒をろ別、ろ液を減圧下に濃縮すると粉末 (110 mg) が得られた。分取用 HPLC (移動相; A 液, 流速: 毎分 3.0 ml, 圧力: 130 kg/cm²) に付し、保持時間 7.00 分 (*rt*_R=0.31) 及び 9.45 分 (*rt*_R=0.42) の分画を分取した (**22** の保持時間=22.50 分)。分取した両フラクションは減圧下に濃縮した。

*rt*_R=0.31 の分画 (21.5 mg) はエタノールから再結晶、無色柱状晶 (10.4 mg) が得られた。mp 196—198°C。UV: 213 (7500), 264 (270), 272 (200)。IR: 3500—3350 (OH), 1600, 1495 (芳香環), 1250—1230 (OSO₃)。NMR

(重ピリジン): 0.84 (3H, s, C₁₈-H), 4.82 (1H, t, $J=8.0$ Hz, C₁₇-H), 5.03 (1H, d, $J=3.0$ Hz, 6 α -H), 7.04—7.50 (4H, m, 芳香環-H). 元素分析 C₁₈H₂₃KO₅S·H₂O 計算値: C, 52.92; H, 6.17; S, 7.85. 実験値: C, 52.72; H, 5.98; S, 7.60.

$r_{\text{R}}=0.42$ の分画 (6.3 mg) は得量が少なく結晶化できなかったが, HPLC (移動相: A 液, 流速: 毎分 1.0 ml, 圧力: 125 kg/cm²) により **18** と同定.

Solvolysis of 18 and 20 **18** 及び **20** をそれぞれ 10% 硫酸 (10 ml) に溶かし, これをエーテルで 48 時間連続抽出. 抽出液は水洗, 乾燥 (Na₂SO₄) 後, 濃縮. それぞれの残渣を HPLC を用いて, 標品の 6 α ,17 β -dihydroxyestra-1,3,5(10)-triene (**19**)¹⁴⁾ 及び 6 β ,17 β -dihydroxyestra-1,3,5(10)-triene (**21**)¹⁴⁾ と比較した. HPLC の条件は移動相: B 液, 流速: 毎分 1.2 ml, 圧力: 120 kg/cm². それぞれの保持時間は以下の通りであった.

化 合 物	保持時間 (分)
Solvolysis product of 18	10.03
19	10.02
Solvolysis product of 20	11.92
21	11.91

引 用 文 献

- 1) K. Shimomura, O. Kamata, S. Ueki, S. Ida, K. Oguri, H. Yoshimura, H. Tsukamoto, *Tohoku J. Exp. Med.*, **105**, 45 (1971); M. Mori, K. Oguri, H. Yoshimura, K. Shimomura, O. Kamata, S. Ueki, *Life Sci.*, **11**, 525 (1972); F. S. LaBella, C. Pinsky, V. Havlicek, *Brain Res.*, **174**, 263 (1979); F. S. LaBella, C. Pinsky, M. E. Christy, C. D. Colton, *Life Sci.*, **30**, 1565 (1982).
- 2) D. Reichert, *Angew. Chem.*, **20**, 135 (1981); J. Caldwell, *Drug Metab. Rev.*, **13**, 745 (1982); B. Coles, *ibid.*, **15**, 1307 (1984).
- 3) S. Bernstein, S. Solomon, "Chemical and Biological Aspects of Steroid Conjugation," Springer-Verlag, 1970, Chapters 5—8.
- 4) M. Ingelman-Sundberg, A. Rane, J. A. Gustafsson, *Biochem.*, **14**, 429 (1975); J. A. Gustafsson, M. Ingelman-Sundberg, *J. Biol. Chem.*, **250**, 3451 (1975).
- 5) A. H. Goldkamp, W. M. Hoehn, R. A. Mikulec, E. F. Nutting, D. L. Cook, *J. Med. Chem.*, **8**, 409 (1965).
- 6) T. Nambara, M. Numazawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **16**, 383 (1968); *idem, ibid.*, **17**, 1200 (1969); *idem, ibid.*, **19**, 990 (1971).
- 7) a) K. Watanabe, I. Yoshizawa, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **5**, 340 (1982); b) *Idem, Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2745 (1984).
- 8) J. Fishman, *Ann. Rev. Physiol.*, **45**, 61 (1983); G. R. Merrian, M. B. Lipsett, "Catechol Estrogens," Ravan Press, New York, 1983, pp. 151—271.
- 9) K. Watanabe, I. Yoshizawa, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **277**, 71 (1983).
- 10) T. Nambara, S. Honma, S. Akiyama, *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 474 (1970).
- 11) M. Numazawa, Y. Ogura, *Chem. Commun.*, **1983**, 533.
- 12) W. J. Musliner, J. W. Gates, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 4271 (1966).
- 13) G. A. Olah, S. C. Narang, B. G. B. Gupta, R. Malhotra, *J. Org. Chem.*, **44**, 1247 (1979).
- 14) T. Nambara, M. Numazawa, H. Takahashi, *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 1725 (1969); O. Wintersteiner, M. Moore, A. I. Cohen, *J. Org. Chem.*, **29**, 1325 (1964).
- 15) S. Burstein, S. Lieberman, *J. Biol. Chem.*, **233**, 331 (1958).
- 16) K. Watanabe, I. Yoshizawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3231 (1982).
- 17) I. Yoshizawa, A. Nakagawa, E. Kamiya, S. Itoh, *Yakugaku Zasshi*, **100**, 867 (1980).
- 18) K. Watanabe, R. Kimura, I. Yoshizawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 2231 (1986).